

УДК 576.858.23

БИОХИМИЯ

Т. М. ДМИТРИЕВА, Е. А. ТОЛЬСКАЯ, Т. Г. СЕНКЕВИЧ, В. И. АГОЛ

**О ДЕЙСТВИИ 2-(α -ОКСИБЕНЗИЛ)-БЕНЗИМИДАЗОЛА
И ГУАНИДИНА НА АКТИВНОСТЬ РНК-ПОЛИМЕРАЗ,
ИНДУЦИРОВАННЫХ ВИРУСАМИ ЭНЦЕФАЛОМИОКАРДИТА
И ПОЛИОМИЕЛИТА**

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 27 XII 1971)

В экстрактах клеток, зараженных пикорнавирусами, обнаруживается ферментативная система синтеза РНК, важными особенностями которой являются сохранение активности в присутствии актиномицина D (ингибитора синтеза РНК на матрице ДНК), наличие эндогенной РНК-матрицы, потребность во всех четырех рибонуклеозидтрифосфатах и образование продуктов, сходных с теми, которые содержатся в зараженной вирусом клетке; соответствующая активность отсутствует в неинфицированной клетке. Эти и некоторые другие свойства ферментативной системы позволили заключить, что она обусловлена наличием вирус-специфической РНК-зависимой РНК-полимеразы (репликазы) (¹⁻³).

Очевидный интерес представляют поиски ингибиторов вирусной РНК-полимеразы. Первыми соединениями, испытанными в этом отношении, были геанидин и 2-(α -оксибензил)-бензимидазол (ОББ), которые эффективно подавляют репродукцию некоторых пикорнавирусов (⁴). Оказалось, что хотя оба соединения препятствуют появлению вирусной РНК-полимеразы в клетках, зараженных полиовирусом, а также некоторыми типами вирусов коксаки и ЕСНО, на активность *in vitro* уже образовавшегося фермента они не влияют (³).

Таблица 1

Действие гуанидина и ОББ на активность РНК-полимераз, индуцированных вирусами энцефаломиокардита и полиомиелита имп/мин на 1 мг белка

№ опыта	Источник фермента	Условия *	Без ингибиторов	Гуанидин, 100 μ г/мл	% от контроля	ОББ, 100 μ г/мл	% от контроля
1	Клетки HeLa, зараженные полиовирусом	А	1 905	1 957	103	1 945	102
		Б	251	210		242	
2	То же	А	11 258	11 414	101	11 078	98
		Б	439	501		428	
3	То же	А	5 002	4 900	98	4 870	97
		Б	645	—		697	
4	Клетки HeLa, зараженные вирусом ЭМК	А	3 003	—	—	1 972	65
		Б	410	—		502	
5	То же	А	3 105	3 021	97	1 839	60
	» »	Б	596	480		574	
6		А	3 298	3 364	102	1 900	58
		Б	276	157		205	
7	Клетки Кребс-2, зараженные вирусом ЭМК	А	1 806	—	—	1 116	62
		Б	154	—		142	
8	То же	А	1 966	1 992	101	1 239	63
		Б	301	295		429	
9	» »	А	5 021	4 944	98	2 928	58
		Б	289	321		255	

* А — полная инкубационная смесь; Б — инкубационная смесь без немеченых АТФ, ЦТФ, УТФ, использованная в качестве контроля.

В настоящей работе показано, что ОББ оказывает заметное угнетающее действие на активность РНК-полимеразы, индуцируемой вирусом энцефаломиокардита (ЭМК), не влияя, в соответствии с литературными данными, на активность полимеразы, индуцированной полиовирусом.

В качестве препаратов фермента использовали микросомально-митохондриальную фракцию, полученные центрифугированием (15 мин., 40 000 g) безъядерного экстракта клеток асцитной карциномы Кребс-2, зараженных вирусом ЭМК (5 час. после заражения), и клеток HeLa, зараженных полиовирусом (штамм Mahoney; 3,5 часа после заражения) или вирусом ЭМК (5 час. после заражения). Получение инфицированных клеток и выделение из них вирусной РНК-полимеразы проводили по методу, описанному в литературе (³, ⁵, ⁶).

Активность фермента оценивали по включению H^3 -ГТФ в кислотонерастворимую фракцию. С этой целью 0,1 мл суспензии РНК-полимеразной фракции (500–1000 мкг белка) инкубировали 1 час при 37° со следующими компонентами в конечном объеме 0,4 мл: АТФ, ЦТФ, УТФ по 0,1 ммоля каждого; H^3 -ГТФ (100 000 имп/мин, удельная активность 1 С/ммоля); фосфоэнолпируват 5 ммоля, пируваткиназа 10 мкг; актиномицин D — 1 мкг; трис-HCl 35 ммоля (pH 8,3 для полимеразы вируса ЭМК, pH 8,1 для полиовирусной полимеразы); $MgCl_2$ 5 ммоля. В контрольных пробах исключали все три немеченых трифосфата. Реакцию останавливали добавлением 0,4 мл 0,125 M пироглутамата натрия и 2 мл 0,5 M $HClO_4$. Кислотонерастворимый продукт промывали на ультрафильтрах «РуФС», и радиоактивность определяли в неполярном

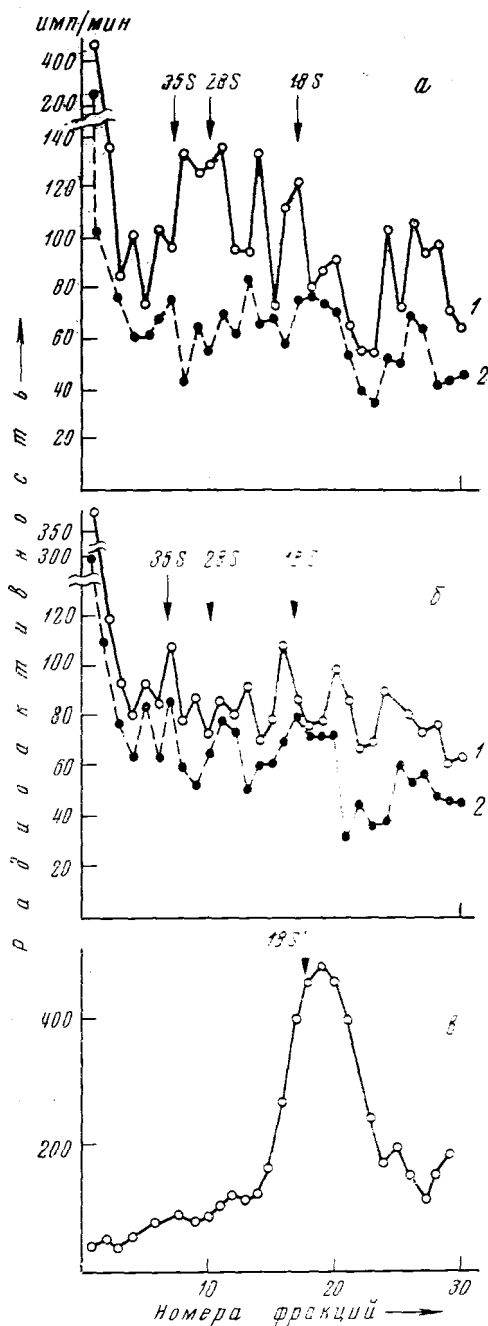


Рис. 1. Анализ продуктов реакции, осуществляемой РНК-полимеразой вируса ЭМК в стандартных условиях (а и б) и в присутствии ОББ (б). 1 — радиоактивность кислотонерастворимого продукта до обработки РНКазой; 2 — то же после обработки РНКазой. в — профиль продукта реакции, обработанного РНКазой до нанесения на градиент

спинтиллаторе на счетчике «МАРК 1» или «ЮНИЛАКС». Данные, представленные в табл. 1, показывают, что ОББ в концентрации 100 мкг/мл снижает активность РНК-полимеразы, индуцируемой вирусом ЭМК, примерно на 35—40%. Этот эффект наблюдается при исследовании полимеразной активности как в экстрактах клеток асцитной карциномы, так и в экстрактах клеток HeLa. С другой стороны, при аналогичных условиях ОББ не влияет на активность РНК-полимеразы, индуцированной вирусом полиомиелита. В то же время ОББ вызывает значительно более выраженное угнетение репродукции полиовируса, чем вируса ЭМК (табл. 2). Гуанидин, угнетающий репродукцию полиовируса, но не вируса ЭМК, не

Таблица 2
Влияние ОББ на репродукцию полиовируса и вируса ЭМК
в клетках HeLa

№ опыта	Вирус	Число инфекционных вирусных единиц на 1 клетку	
		контроль	в присутствии ОББ, 100 мкг/мл
1	Полиовирус	530	0,025
2	Полиовирус	690	0,025
3	Вирус ЭМК	440	200
4	Вирус ЭМК	510	320

оказывает действия на ферментативную активность, индуцированную обоими вирусами.

Представлял интерес вопрос о том, не оказывает ли ОББ избирательное угнетающее действие на синтез определенных классов вирус-специфических РНК (двунитчатой репликативной формы, многонитчатого репликативного предшественника или однонитчатой вирусной РНК).

Были изучены продукты, которые образуются в используемой нами бесклеточной системе. Выделение продуктов, синтезируемых в данной системе, и разделение их в градиенте плотности сахарозы проводили по методу, предложенному в лаборатории Мартина (7). РНК, синтезированную в бесклеточной системе, экстрагировали фенолом в присутствии додецилсульфата натрия и анализировали в линейном градиенте сахарозы (5—20% сахарозы в 0,1 М КСl; 0,01 М трис-НСl, 0,001 М ЭДТА, рН 7,5). Центрифугирование проводили в течение 15 час. при 22 000 об/мин при 4° в роторе SW 251. Фракции собирали путем прокалывания дна пробирки. Половину каждой фракции обрабатывали панкреатической РНКазой (10 мкг/мл; 0,3 М NaCl, 0,03 М цитрат натрия; 30 мин. при 37°). Кислотонерастворимый продукт промывали, и радиоактивность определяли, как указано выше.

На рис. 1а приведен профиль радиоактивности, полученный при фракционировании в градиенте плотности сахарозы продукта, синтезированного *in vitro* РНК-полимеразой вируса ЭМК. Синтезированная РНК имеет достаточно высокую скорость осаждения и гетерогенное распределение, причем значительная часть материала обладает устойчивостью к гидролитическому действию панкреатической РНКазы. Если же синтезированный продукт обрабатывали РНКазой до нанесения на градиент, то метка распределялась в основном единым пиком, осаждающимся со скоростью, несколько меньшей 18S (рис. 1б). Учитывая эти данные можно заключить, что основным продуктом синтеза в нашей системе является репликативный предшественник, а также, возможно, некоторое количество репликативной формы и одноцепочечной РНК.

Сравнение рис. 1а и 1б показывает, что в присутствии ОББ имеет место относительное угнетение синтеза одноцепочечных (чувствительных к РНКазе) полинуклеотидов. В этом отношении действие ОББ на синтез

РНК вируса ЭМК в бесклеточной системе напоминает действие гуанидина на синтез РНК полиовируса в зараженных этим вирусом клетках (⁸⁻¹⁰).

Таким образом, основной результат работы заключается в обнаружении угнетающего влияния ОББ на активность РНК-полимеразы вируса ЭМК *in vitro*. Это влияние относительно невелико, но вполне достоверно. По своей величине оно сопоставимо с угнетением репродукции вируса ЭМК, наблюдаемым в присутствии этого ингибитора. Поэтому можно предположить, что угнетение репродукции вируса ЭМК, вызываемое ОББ, обусловлено снижением активности вирусной РНК-полимеразы. Действие ОББ на РНК-полимеразу вируса ЭМК специфично в том смысле, что это соединение не оказывает влияния на активность полимеразы, индуцированной близким по структуре вирусом полиомиелита, хотя угнетение репродукции вируса полиомиелита в присутствии ОББ выражено значительно сильнее, чем угнетение репродукции вируса ЭМК. Можно считать, что ОББ тормозит репродукцию двух разных пикорнавирусов при помощи двух различных механизмов.

В заключение авторы хотят выразить искреннюю благодарность Н. И. Чемерис за участие в постановке ряда опытов.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
13 XII 1971

Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов
Академии медицинских наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ D. Baltimore, R. M. Franklin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **9**, 388 (1962). ² D. Baltimore, R. M. Franklin, *J. Biol. Chem.*, **238**, 395 (1963). ³ D. Baltimore, H. J. Eggers et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **49**, 843 (1963). ⁴ I. Tamm, H. J. Eggers, *Science*, **142**, 24 (1963). ⁵ E. M. Martin, J. Malec et al., *Biochem. J.*, **80**, 585 (1961). ⁶ E. Norton, S. Liu et al., *J. Mol. Biol.*, **15**, 62 (1966). ⁷ L. Dalgarno, E. M. Martin et al., *ibid.*, **15**, 77 (1966). ⁸ L. Caliguri, I. Tamm, *Virology*, **35**, 408 (1968). ⁹ J. Noble, L. Levintow, *ibid.*, **40**, 634 (1970). ¹⁰ P. D. Copper, D. Stancek, D. F. Summers, *ibid.*, **40**, 971 (1970).